

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant : Shunsuke ISHII et al. **Mail Stop PCT**
Appl. No: Not Yet Assigned (National Phase of PCT/JP2003/013855)
I. A. Filed : October 29, 2003
For : PRODUCTION OF KNOCKDOWN ANIMAL VIA INTRODUCTION OF DOUBLE-STRANDED RNA EXPRESSION VECTOR

CLAIM OF PRIORITY

Commissioner for Patents
U.S. Patent and Trademark Office
Customer Service Window, Mail Stop PCT
Randolph Building
401 Dulany Street
Alexandria, VA 22314

Sir:

Applicant hereby claims the right of priority granted pursuant to 35 U.S.C. 119 and 365 based upon Japanese Application No. 2002-314764, filed October 29, 2002. The International Bureau already should have sent a certified copy of the Japanese application to the United States designated office. If the certified copy has not arrived, please contact the undersigned.

Respectfully submitted,
Shunsuke ISHII et al.


Bruce H. Bernstein
Reg. No. 29,027


Leslie J. Paperner
Reg. No. 33,329

April 27, 2005
GREENBLUM & BERNSTEIN, P.L.C.
1950 Roland Clarke Place
Reston, VA 20191
(703) 716-1191

10/533078

Rec'd PCT/PTO 28 APR 2005

PCT/JP03/13855

29.10.03

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日
Date of Application:

2002年10月29日

出願番号
Application Number:

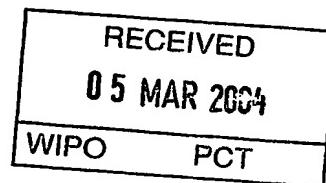
特願2002-314764

[ST. 10/C]:

[JP 2002-314764]

出願人
Applicant(s):

オリエンタル酵母工業株式会社
独立行政法人理化学研究所

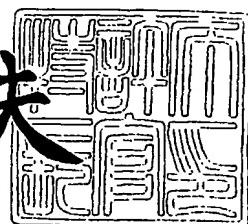


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 2月19日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



出証番号 出証特2003-3100148

【書類名】 特許願
【整理番号】 P02-0703
【提出日】 平成14年10月29日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12N 15/00
【発明の名称】 二本鎖RNA発現ベクターの導入によるトランスジェニック動物の作製
【請求項の数】 29
【発明者】
【住所又は居所】 茨城県つくば市高野台3丁目1番地1 理化学研究所
筑波研究所内
【氏名】 石井 俊輔
【発明者】
【住所又は居所】 茨城県つくば市高野台3丁目1番地1 理化学研究所
筑波研究所内
【氏名】 品川 敏恵
【発明者】
【住所又は居所】 東京都板橋区小豆沢三丁目6番10号 オリエンタル酵母工業株式会社内
【氏名】 内田 浩二
【発明者】
【住所又は居所】 東京都板橋区小豆沢三丁目6番10号 オリエンタル酵母工業株式会社内
【氏名】 林 直木
【特許出願人】
【識別番号】 000103840
【氏名又は名称】 オリエンタル酵母工業株式会社

【特許出願人】

【識別番号】 000006792

【氏名又は名称】 理化学研究所

【代理人】

【識別番号】 100091096

【弁理士】

【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】

【識別番号】 100118773

【弁理士】

【氏名又は名称】 藤田 節

【選任した代理人】

【識別番号】 100096183

【弁理士】

【氏名又は名称】 石井 貞次

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015244

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9503608

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 二本鎖RNA発現ベクターの導入によるトランスジェニック動物の作製

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 目的遺伝子の二本鎖RNAを有することを特徴とする目的遺伝子ノックアウト動物。

【請求項 2】 目的遺伝子の二本鎖RNAの形成により内在性の目的遺伝子のmRNAが破壊されていることを特徴とする目的遺伝子ノックアウト動物。

【請求項 3】 目的遺伝子の二本鎖RNAが二本鎖RNA発現ベクターの導入により形成されるものである、請求項1又は2記載の目的遺伝子ノックアウト動物。

【請求項 4】 二本鎖RNA発現ベクターが、以下の(a)～(c)：

(a) 以下の(a-1)又は(a-2)の塩基配列：

(a-1) 目的遺伝子の全部若しくは一部をコードする塩基配列、又は

(a-2) (a-1)の塩基配列に対し相補的な配列からなるDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするDNAをコードする塩基配列；

(b) (a)の塩基配列に対し相補的であり、かつ逆配向の塩基配列；及び

(c) ループ領域をコードし、上記(a)の塩基配列と(b)の塩基配列とを連結する配列；

を含み、それらがRNAに転写された際に、ステム・ループ構造を有する二本鎖RNA(ds-RNA)が形成されるものである、請求項3記載の目的遺伝子ノックアウト動物。

【請求項 5】 目的遺伝子がSk*i*遺伝子である、請求項1～4のいずれか1項に記載の目的遺伝子ノックアウト動物。

【請求項 6】 目的遺伝子の二本鎖RNAを有することを特徴とする疾患モデル動物。

【請求項 7】 目的遺伝子の二本鎖RNAの形成により内在性の目的遺伝子のmRNAが破壊されていることを特徴とする疾患モデル動物。

【請求項 8】 目的遺伝子の二本鎖RNAの発現が二本鎖RNA発現ベクタ

一の導入により形成されるものである、請求項6又は7記載の疾患モデル動物。

【請求項9】 二本鎖RNA発現ベクターが、以下の(a)～(c)：

(a) 以下の(a-1)又は(a-2)の塩基配列：

(a-1) 目的遺伝子の全部若しくは一部をコードする塩基配列、又は

(a-2) (a-1)の塩基配列に対し相補的な配列からなるDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするDNAをコードする塩基配列；

(b) (a)の塩基配列に対し相補的であり、かつ逆配向の塩基配列；及び

(c) ループ領域をコードし、上記(a)の塩基配列と(b)の塩基配列とを連結する配列；

を含み、それらがRNAに転写された際に、ステム・ループ構造を有する二本鎖RNA(ds-RNA)が形成されるものである、請求項8記載の疾患モデル動物。

【請求項10】 目的遺伝子がSk i遺伝子である、請求項6～9のいずれか1項に記載の疾患モデル動物。

【請求項11】 疾患が、神経管閉塞異常、虹彩形成異常、及び頭部での出血からなる群より選択されるものである、請求項10記載の疾患モデル動物。

【請求項12】 動物がマウスである、請求項6～11のいずれか1項に記載の疾患モデル動物。

【請求項13】 目的遺伝子の二本鎖RNAを形成させることにより内在性の目的遺伝子のmRNAを破壊することを特徴とする、目的遺伝子ノックアウト動物の作出方法。

【請求項14】 目的遺伝子の二本鎖RNAの形成を二本鎖RNA発現ベクターの導入による行うものである、請求項13記載の作出方法。

【請求項15】 目的遺伝子がSk i遺伝子である、請求項13又は14記載の作出方法。

【請求項16】 目的遺伝子の二本鎖RNAを形成させることにより内在性の目的遺伝子のmRNAを破壊することを特徴とする、疾患モデル動物の作出方法。

【請求項17】 目的遺伝子の二本鎖RNAの形成を二本鎖RNA発現ベク

ターの導入による行うものである、請求項16記載の作出方法。

【請求項18】 目的遺伝子がSki遺伝子である、請求項16又は17記載の作出方法。

【請求項19】 疾患が、神経管閉塞異常、虹彩形成異常、及び頭部での出血からなる群より選択されるものである、請求項18記載の作出方法。

【請求項20】 動物がマウスである、請求項16～19のいずれか1項に記載の作出方法。

【請求項21】 以下の(a)～(c)：

(a) 以下の(a-1)又は(a-2)の塩基配列：

(a-1) 目的遺伝子の全部若しくは一部をコードする塩基配列、又は

(a-2) (a-1)の塩基配列に対し相補的な配列からなるDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするDNAをコードする塩基配列；

(b) (a)の塩基配列に対し相補的であり、かつ逆配向の塩基配列；及び

(c) ループ領域をコードし、上記(a)の塩基配列と(b)の塩基配列とを連結する配列；

を含み、それらがRNAに転写された際に、ステム・ループ構造を有する二本鎖RNA(ds-RNA)が形成されることを特徴とする、二本鎖RNA発現ベクター。

【請求項22】 目的遺伝子がSki遺伝子である、請求項21記載の二本鎖RNA発現ベクター。

【請求項23】 目的遺伝子の一部がSki遺伝子の5'側540bpの部分である、請求項21又は22記載の二本鎖RNA発現ベクター。

【請求項24】 (c)の塩基配列が配列番号2に示すものである、請求項21～23のいずれか1項に記載の二本鎖RNA発現ベクター。

【請求項25】 さらに発生過程特異的プロモーターを含むものである、請求項21～24のいずれか1項に記載の二本鎖RNA発現ベクター。

【請求項26】 発生過程特異的プロモーターがサイトメガロウイルス(CMV)初期遺伝子プロモーターである、請求項25記載の二本鎖RNA発現ベクター。

【請求項27】 さらに(a)～(c)の塩基配列の上流にリボザイム部位を含むものである、請求項21～26のいずれか1項に記載の二本鎖RNA発現ベクター。

【請求項28】 さらに(a)～(c)の塩基配列の下流にMAZドメイン配列を含むものである、請求項21～27のいずれか1項に記載の二本鎖RNA発現ベクター。

【請求項29】 請求項21～28のいずれか1項に記載の二本鎖RNA発現ベクターを導入した動物細胞。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、目的遺伝子の二本鎖RNAの形成により内在性の目的遺伝子のmRNAが破壊されている、目的遺伝子ノックアウト動物及び疾患モデル動物、並びに該動物の作出方法に関する。また本発明は、該作出方法において用いる二本鎖RNA発現ベクター、及び該ベクターを導入した動物細胞に関する。

【0002】

【従来の技術】

特異的な遺伝子の変異マウスは発生学などの基礎科学分野ばかりでなく、疾患モデルマウスとして応用科学分野においても重要な価値を持つ。種々の疾患の診断方法や治療薬の開発には疾患モデルマウスは大変有用である。現在一般的に用いられているES細胞を用いた変異マウスの作製方法はCapechiらの基礎的な研究によって開発された（非特許文献1）。この方法では以下のようない手順に従つて、変異マウスが作製される。1）まず目的遺伝子のゲノムクローンを分離し、機能に必須なエキソン領域をネオマイシンなどの薬剤耐性遺伝子に置換したターゲティングベクターを作製する。2）このターゲティングベクターをES細胞にエレクトロポレーション法などにより導入し、相同組み換えによりES細胞の持つ遺伝子がターゲティングベクターによって置換された組換え細胞を分離する。3）この組み換え細胞を8細胞期胚に導入し、キメラマウスを作製する。4）キメラマウスのうちES細胞由来の生殖細胞が形成されているマウスを選別し、交

配によってホモ変異マウスを得る。このように現在一般的に用いられている変異マウス作製方法は多くのステップを含むため、通常は1年程度の時間と多大な労力を必要とする。

【0003】

最近RNA干渉 (RNA interference) という現象が注目を浴びている。これはもともと線虫 (*C. elegans*)、ショウジョウバエ、植物などで見出された現象で、特異的なmRNAの配列に対応する二本鎖RNAを細胞に導入すると、その細胞において転写されたmRNAが速やかに壊れる現象である（非特許文献2及び特許文献1及び2参照）。最近このRNA干渉は動物の培養細胞やマウス個体でも起きることが示されている（非特許文献3及び4並びに特許文献3参照）。これまでの一連の解析により、培養細胞などに導入した二本鎖RNAは約22ヌクレオチドの小さなRNAに分解され、これがmRNAにハイブリダイズすることによって、mRNAの分解を誘導することが示されている。ショウジョウバエや線虫では長い二本鎖RNAによってmRNAの分解が誘導されることは多くの実験によって確認されている。一方、動物細胞においては、20～30ヌクレオチドの短い二本鎖RNAによってmRNAの分解が誘導されることは確認されているが、長い二本鎖RNAは配列非特異的に多くのmRNAを壊すことも示唆されている（非特許文献3及び特許文献4）。また動物細胞では、ウイルス感染などによってキナーゼが二本鎖RNAによって活性化され、インターフェロンシグナル伝達経路が活性化されることも指摘されている（非特許文献5）。

【0004】

実際に上述したようなトランスジェニック動物を作製する過程において、特に長い二本鎖RNAを動物細胞において発現させた場合には、配列非特異的にタンパク質の合成が阻害され、またインターフェロンを誘導する経路が活性化されることも報告されており、このような問題点をどのように克服するかは現在の課題である。

【0005】

【特許文献1】

特表2002-516062号公報

【特許文献2】

特表平8-506734号公報

【特許文献3】

特表2002-507416号公報

【特許文献4】

国際特許出願WO00/175164号パンフレット

【0006】

【非特許文献1】

Capecchi, MR., Science (USA), 1989年, 第244巻, p.1288-1292 (review)

【非特許文献2】

Hannon, GJ., Nature, 2002年, 第418巻, p.244-251 (review)

【非特許文献3】

Elbashir, SM. et al., Nature, 2001年, 第411巻, p.494-498

【非特許文献4】

McCaffrey, AP. et al., Nature, 2002年, 第418巻, p.38-39

【非特許文献5】

Kaufman, RJ. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999年, 第96巻, p.11693-11695

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、目的遺伝子がノックアウトされた動物を簡便かつ迅速に作出する方法及びそのツールを提供することを目的とする。

【0008】

【発明を解決するための手段】

本発明者は、上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、目的遺伝子の二本鎖RNAを特異的な組織で発現するトランスジェニック動物を作製することができれば、目的遺伝子のノックアウト動物を簡便かつ迅速に作製できると考えた

。そこで本発明者は、目的遺伝子として転写因子 S k i を選択し、この S k i 遺伝子の mRNA 配列に対応する 540 bp の二本鎖 RNA を発現するベクターを作製し、この発現ベクターを導入したトランスジェニックマウスを作製したところ、このトランスジェニックマウスが従来の S k i 変異マウスと同様に、発生途中において形態形成異常や出血などの異常を示すことを確認した。そのような結果から、本発明者は、RNA 干渉を利用することによって、短時間で特異的に S k i 遺伝子の変異マウスの作製が可能であることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、目的遺伝子の二本鎖 RNA を有することを特徴とする目的遺伝子ノックアウト動物である。

【0009】

また上記目的遺伝子ノックアウト動物は、目的遺伝子の二本鎖 RNA の形成により内在性の目的遺伝子の mRNA が破壊されていることを特徴とするものである。ここで目的遺伝子の二本鎖 RNA は、二本鎖 RNA 発現ベクターの導入により形成されることが好ましい。該二本鎖 RNA 発現ベクターとしては、例えば、以下の (a) ~ (c) :

(a) 以下の (a-1) 又は (a-2) の塩基配列：

(a-1) 目的遺伝子の全部若しくは一部をコードする塩基配列、又は

(a-2) (a-1) の塩基配列に対し相補的な配列からなる DNA とストリンジエントな条件下でハイブリダイズする DNA をコードする塩基配列；

(b) (a) の塩基配列に対し相補的であり、かつ逆配向の塩基配列；及び

(c) ループ領域をコードし、上記 (a) の塩基配列と (b) の塩基配列とを連結する配列；

を含み、それらが RNA に転写された際に、ステム・ループ構造を有する二本鎖 RNA (ds-RNA) が形成されるものが挙げられる。

【0010】

また上記目的遺伝子ノックアウト動物において、目的遺伝子としては、限定するものではないが、S k i 遺伝子が挙げられる。

本発明はまた、目的遺伝子の二本鎖 RNA を有することを特徴とする疾患モデ

ル動物である。

【0011】

上記疾患モデル動物は、目的遺伝子の二本鎖RNAの形成により内在性の目的遺伝子のmRNAが破壊されていることを特徴とするものである。ここで目的遺伝子の二本鎖RNAは、二本鎖RNA発現ベクターの導入により形成されが好ましい。該二本鎖RNA発現ベクターとしては、例えば、以下の(a)～(c)：

(a) 以下の(a-1)又は(a-2)の塩基配列：

(a-1) 目的遺伝子の全部若しくは一部をコードする塩基配列、又は

(a-2) (a-1)の塩基配列に対し相補的な配列からなるDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするDNAをコードする塩基配列；

(b) (a)の塩基配列に対し相補的であり、かつ逆配向の塩基配列；及び

(c) ループ領域をコードし、上記(a)の塩基配列と(b)の塩基配列とを連結する配列；

を含み、それらがRNAに転写された際に、ステム・ループ構造を有する二本鎖RNA(ds-RNA)が形成されるものが挙げられる。

【0012】

また上記疾患モデル動物において、目的遺伝子としては、限定するものではないが、Ski遺伝子が挙げられる。疾患としては、例えば神経管閉塞異常、虹彩形成異常、及び頭部が挙げられる。上記疾患モデル動物は、マウスであることが好ましい。

【0013】

さらに本発明は、目的遺伝子の二本鎖RNAを形成させることにより内在性の目的遺伝子のmRNAを破壊することを特徴とする、目的遺伝子ノックアウト動物の作出方法である。

【0014】

上記作出方法において、目的遺伝子の二本鎖RNAの形成は、例えば二本鎖RNA発現ベクターの導入により行うことができる。また目的遺伝子としては、例えばSki遺伝子が挙げられる。

またさらに本発明は、目的遺伝子の二本鎖RNAを形成させることにより内在性の目的遺伝子のmRNAを破壊することを特徴とする、疾患モデル動物の作出方法である。

【0015】

上記作出方法において、目的遺伝子の二本鎖RNAの形成は、例えば上記二本鎖RNA発現ベクターの導入により行うことができる。ここで目的遺伝子としては、例えばSki遺伝子が挙げられる。また疾患としては、神経管閉塞異常、虹彩形成異常、及び頭部での出血が挙げられる。また動物はマウスを用いることが好ましい。

【0016】

本発明はまた、二本鎖RNA発現ベクターであり、該ベクターは、以下の(a)～(c)：

(a) 以下の(a-1)又は(a-2)の塩基配列：

(a-1) 目的遺伝子の全部若しくは一部をコードする塩基配列、又は

(a-2) (a-1)の塩基配列に対し相補的な配列からなるDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするDNAをコードする塩基配列；

(b) (a)の塩基配列に対し相補的であり、かつ逆配向の塩基配列；及び

(c) ループ領域をコードし、上記(a)の塩基配列と(b)の塩基配列とを連結する配列；

を含み、それらがRNAに転写された際に、ステム・ループ構造を有する二本鎖RNA(ds-RNA)が形成されることを特徴とするものである。

【0017】

上記ベクターにおいて、目的遺伝子としては、例えばSki遺伝子が挙げられる。また目的遺伝子の一部としては、例えばSki遺伝子の5'側540bpの部分を用いることができる。また(c)の塩基配列としては、例えば配列番号2に示すものが挙げられる。

【0018】

上記ベクターには、さらに発生過程特異的プロモーターが含まれていてよい。該発生過程特異的プロモーターとしては、例えばサイトメガロウイルス(CMV

V) 初期遺伝子プロモーターが挙げられる。

また上記ベクターには、さらに(a)～(c)の塩基配列の上流にリボザイム部位、及び／又は(a)～(c)の塩基配列の下流にMAZドメイン配列が含まれていてもよい。

本発明はさらに、上記二本鎖RNA発現ベクターを導入した動物細胞である。

【0019】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明は、RNA干渉を利用して目的遺伝子をノックアウトしたトランスジェニック動物に関し、そのトランスジェニック動物を簡便かつ迅速に作出するためのツール（二本鎖RNA発現ベクター）及び方法を提供するものである。

【0020】

本発明者は、RNA干渉を利用してトランスジェニック動物を作出するにあたり、目的遺伝子の二本鎖RNAを特異的な組織で発現させるために、適切な二本鎖RNAの長さ、適切なプロモーターなどを選択することが重要であると考えた。このため、変異マウスの表現型が詳細に解析されている転写因子Sk iを選択して実験を行い、トランスジェニック動物における二本鎖RNAの発現を確認した。またSk iの変異は胎仔の段階で種々の形態異常を示すことが知られているため、二本鎖RNAの発現及び形成により目的遺伝子がノックアウトされているか否かを発生初期の段階で解析することができた。

以下に本発明に係る目的遺伝子ノックアウト動物及び疾患モデル動物、並びにその作出方法などについて記載する。

【0021】

1. RNA干渉 (RNA interference)

RNA干渉とは、二本鎖を形成しているRNA（以下、「二本鎖RNA」又は「ds-RNA」ともいう）が細胞内に存在する場合に、そのRNAの塩基配列に相同意の内在性のmRNAが分解・破壊されて、結果としてその細胞での遺伝子発現が特異的に抑制される現象であり、RNAインターフェアランス、RNAiとも称される。このRNA干渉は、最初に線虫で報告され、その後ショウジョ

ウバエ、植物、哺乳動物細胞などにおいても確認されている。例えばショウジョウバエにおいては、ヘアピン型の二本鎖RNAを作製し、これが細胞内で二本鎖RNAとして認識されて、内在性のmRNAが分解・破壊されるという手法が知られている。このヘアピン型の二本鎖RNAによりコードされる遺伝子を任意のものに設定することによって、任意の遺伝子をノックアウトすることができる。しかしながら哺乳動物個体におけるRNA干渉の機構に関してはまだ未知の部分が多く、現在は試行錯誤によるものであって一般的な手法としては確立されていない。また哺乳動物個体において二本鎖RNAを発現させようとする場合、位置効果などにより必ずしもRNA干渉が達成されるものではなかった。また特に長い二本鎖RNAを動物細胞で発現させた場合には、配列非特異的にタンパク質の合成が阻害されたり、インターフェロンを誘導する経路が活性化されたりすることが報告されている。

【0022】

2. 二本鎖RNA発現ベクターの構築

本発明に係る二本鎖RNA発現ベクター（以下、「本ベクター」ともいう）は、上記RNA干渉を行うために必要な、目的遺伝子の二本鎖RNAが発現・形成されるように動物細胞及び個体に導入することができる。本発明において「発現」とは、例えば二本鎖RNAを例として説明した場合、二本鎖RNAをコードするDNAが、二本鎖RNAを形成するようなmRNAに転写されることを指す。また一般的には「発現」とは、遺伝子をコードするDNAがmRNAに転写されて、さらにmRNAがタンパク質に翻訳されることを指し、本発明においては上記両者を意味するものとする。また「目的遺伝子の二本鎖RNA」とは、目的遺伝子に対してRNA干渉を引き起こす二本鎖RNAを指し、具体的には、目的遺伝子に対し相同的な配列を有する二本鎖RNAのことをいう。この目的遺伝子の二本鎖RNAは、本ベクター上において以下の(a)～(c)の塩基配列：

(a) 以下の(a-1)又は(a-2)の塩基配列：

(a-1) 目的遺伝子の全部若しくは一部をコードする塩基配列、又は

(a-2) (a-1)の塩基配列に対し相補的な配列からなるDNAとストリングジェントな条件下でハイブリダイズするDNAをコードする塩基配列；

(b) (a) の塩基配列に対し相補的であり、かつ逆配向の塩基配列；及び
(c) ループ領域をコードし、上記 (a) の塩基配列と (b) の塩基配列とを連結する配列；

によりコードされ、それらがRNAに転写された際に、ステム・ループ構造を有する二本鎖RNA (ds-RNA) が形成される。本発明において「ステム・ループ構造」とは、相補性により二本鎖を形成しているステム領域と、その二本鎖を連結しているが一本鎖のループ状の形態をとるループ領域とからなる構造であり、この構造は分子生物学においては周知である。

【0023】

上記 (a) の塩基配列は、ノックアウト対象のSk i 遺伝子の全部若しくは一部をコードする塩基配列である (a-1)。目的遺伝子とは、RNA干渉を利用してノックアウトさせようとする遺伝子であれば特に限定されるものではなく、疾患に関連すると推測される遺伝子、その他の機能に関連すると推測される遺伝子、その他の研究対象の遺伝子などのあらゆるものを利用遺伝子として取り上げることができる。具体的な目的遺伝子の例としては、限定するものではないが、Sk i 遺伝子、その他の転写因子、癌関連遺伝子などが挙げられる。

【0024】

Sk i 遺伝子は、最初に発癌遺伝子として同定され、最近になって転写コリプレッサーとして機能することが明らかにされている (Nomura, T. et al., Genes & Development 13: 412-423, 1999)。転写コリプレッサーは種々のリプレッサーに結合して転写抑制を引き起こす因子である。その1種であるSk iは、様々な発生段階において重要な役割を果たしている。Sk i 遺伝子は、ヒト、マウス、カエル、ハエなどから単離され、その塩基配列は公知となっており、GenBankに登録されている（登録番号：ヒト（X15218）、マウス（AF435852）、カエル（X68683）、ハエ（NT_033778））。本発明においては、そのような登録されている塩基配列情報に基づいて (a) の配列を設計することができる。目的遺伝子の「一部」とは、RNA干渉を利用して当該遺伝子をノックアウトできる程度の長さの配列を指し、例えば、500～1000 bp、好ましくは500～700 bpのものである。ここでSk i 遺伝子を用

いる場合には、例えばSkiタンパク質のN末端領域に相当する約500～1000bpの配列が好ましい。特に本発明においては、(a)の塩基配列として、Ski遺伝子の5'側540bpの配列(配列番号1)を用いることが好ましい。配列番号1は、マウスSki遺伝子(GenBank登録番号AF435852)に基づくものであり、その塩基配列1～540番に相当する。

【0025】

また(a)の塩基配列としては、目的遺伝子の全部若しくは一部をコードする塩基配列に対し相補的な配列からなるDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズする塩基配列も含まれる(a-2)。このような塩基配列であっても、目的遺伝子に対してある程度の相同性を有するものであればRNA干渉を行うことは可能である。ストリンジエントな条件とは、特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。例えば、高い相同性(相同性が60%以上、好ましくは80%以上)を有するDNAがハイブリダイズする条件をいう。より具体的には、ナトリウム濃度が150～900mM、好ましくは600～900mMであり、温度が60～68、好ましくは65℃での条件をいう。

【0026】

(b)の塩基配列は、上述した(a)の塩基配列に対し相補的であり、かつ逆配向の塩基配列である。ここで「相補的」とは、厳密な相補性を指すものではなく、(a)の塩基配列と相補性により二本鎖を形成できる程度であればよい。また「逆配向」とは、ベクターに挿入されている配列の向きに関するものであり、例えば(a)の塩基配列がATCGAGTCで挿入されている場合には、(b)の塩基配列はGACTCGATで挿入されることとなる。

【0027】

(c)の塩基配列は、ループ領域をコードするものであり、また上記(a)の塩基配列と(b)の塩基配列とを連結する。「ループ領域」とは、その領域の塩基配列が相補性などにより自己会合せずに一本鎖のループのような状態となる塩基配列部分を指し、このようなループ領域をコードする塩基配列の設計手法は当技術分野で周知である。ループ領域の長さは、約6～15bp、好ましくは約1

2 bp である。本発明において好ましい (c) の塩基配列を配列番号 2 に示す。しかし、本発明において利用可能な配列はこれに限定されるものではない。

【0028】

上記 (a) ~ (c) の塩基配列は、図1B に示すように (c) の塩基配列を中心として連結されている。従って、これらの配列は、RNA に転写された際に、(a) 及び (b) の塩基配列が相補性により自己会合することによって、ステム・ループ構造を有する二本鎖 RNA (ds-RNA) を形成することになる。この二本鎖 RNA が目的遺伝子に対し RNA 干渉を引き起こす。

【0029】

また本ベクターには、上記二本鎖 RNA の領域の配列が転写されて二本鎖 RNA が形成されるように、プロモーター及び／又はその他の制御配列を機能しうる形で連結して挿入してもよい。「機能しうる形で連結して挿入する」とは、本ベクターが導入されるトランスジェニック動物において、プロモーター及び／又は他の制御配列の制御下に上記目的遺伝子の二本鎖 RNA が発現・形成されて内在性の目的遺伝子の mRNA が破壊・分解されるように、プロモーター及び／又は他の制御配列を連結してベクターに組み込むことを意味する。本ベクターに組み込むことが可能なプロモーター及び／又は制御配列は特に限定されるものではなく、構成的プロモーター、組織特異的プロモーター、時期特異的プロモーター、その他の調節エレメントなど、当技術分野で公知のプロモーター及び／又は制御配列を、ノックアウト対象の動物、ノックアウト対象の目的遺伝子の性質などの複数の条件に応じて適宜選択することができる。例えば Ski 遺伝子をノックアウトさせた疾患モデル動物を作出する場合、Ski 遺伝子に関連する疾患は発生過程において発症することが知られているため、本ベクターに組み込むプロモーターとしては、例えば発生過程特異的プロモーターを用いることが好ましい。

【0030】

発生過程特異的プロモーターとは、本発明においては発生過程において特異的に発現することが示されたプロモーターを指す。このようなプロモーターは当技術分野で周知であり、例えば限定するものではないが、サイトメガロウイルス (

CMV) 初期遺伝子プロモーター、インスリン遺伝子プロモーター、Lck 遺伝子プロモーター、CD19 遺伝子プロモーター、Nestin 遺伝子プロモーターなどが挙げられる。上記例示したプロモーターは、当技術分野で公知であり、当業者であればその配列情報などを容易に入手できる。

【0031】

さらに、動物細胞においては二本鎖RNAが核から細胞質に運搬される際に種々のmRNAの翻訳を阻害したり、二本鎖RNA依存的なキナーゼを活性化する可能性がある。このような問題を防ぐために、本ベクターには、リボザイム部位及び／又はMAZドメイン配列を連結してもよい。リボザイム部位とは、その部位において自己触媒的に切断されうる配列の1種を指す (Huang. Y., Mol. Cell Biol. 16: 1534-1542, 1996)。リボザイム部位の塩基配列は、当業者であれば容易に設計することができ、例えば限定するものではないが、配列番号3に示す配列が挙げられる。mRNAの細胞質への移行には5'末端のキャップ構造が重要であるため (McKendrick, L. et al., Mol. Cell Biol. 21: 3632-3641, 2001)、目的遺伝子の二本鎖RNAの転写開始点のすぐ下流にリボザイム部位を挿入し、転写によって合成された二本鎖RNAからキャップ構造を取り除くことによって上記問題を回避することができる。リボザイム部位の存在により、転写された二本鎖RNAは自己触媒的にこの部位で切断され、キャップ構造が除去される。

【0032】

またMAZドメイン配列とは、転写を終結させる配列の1種を指す (Yonaha, M. et al., Mol. Cell 3: 593-600, 1999; Honaha, M. et al., EMBO J. 19: 3770-3777, 2000)。このMAZドメイン配列もまた当業者であれば容易に設計することができる。MAZドメインの配列の一例を配列番号4に示すが、これに限定されるものではない。mRNAの細胞質への移行には3'末端のポリ(A)鎖が重要であり (Huang. Y., 前掲)、ポリ(A)の存在によりmRNAは細胞質へ移行する。しかし本発明においては、転写されて形成された二本鎖RNAを核内に保持させ、RNA干渉を引き起こす必要がある。そこでポリ(A)を除去すればこの問題は解決するが、一般的にポリ(A)付加シグナルは転写の終結に必要である。従って本発明者は、ベクター上のポリ(A)付加シグナルを除き、代わ

りに、転写を終結させることが報告されているMAZドメイン配列を挿入することによって上記問題を回避することができると考えた。MAZドメイン配列の存在により、二本鎖RNAの転写はMAZドメインにより終結し、合成される二本鎖RNAにはポリ(A)鎖は付加されない。

【0033】

適当なベクターに上記構成要素を挿入するには、まず、精製されたDNAを適当な制限酵素で切断し、適当なベクターDNAの制限酵素部位又はマルチクローニングサイトに挿入してベクターに連結する方法等が採用される。上記構成要素のDNAは、当技術分野で公知の手法により合成し、精製することができる。

【0034】

本ベクターとして利用しうるベクターとしては、プラスミドDNA、コスミドDNA、細菌人工染色体(BAC)DNA、レトロトранスポゾンDNA、酵母人工染色体(YAC)DNA、P1ファージ由来人工染色体(PAC)DNAなどが挙げられるが、特に長さが短いpUC系プラスミド(例えば1~3kb程度)が好ましい。

【0035】

このようにして作製されたベクターは、細胞、組織及び/又は個体に導入することにより目的遺伝子の二本鎖RNAの発現及び形成を導くものであり、これが内在性の目的遺伝子のmRNAを破壊・分解する。

【0036】

3. トランスジェニック動物(目的遺伝子ノックアウト動物)の作出

本発明に係る目的遺伝子ノックアウト動物(トランスジェニック動物)は、目的遺伝子の二本鎖RNAを有することを特徴とするものであり、目的遺伝子の二本鎖RNAの形成により内在性の目的遺伝子のmRNAが破壊されているものである。このトランスジェニック動物は、上記構築された二本鎖RNA発現ベクターを動物細胞に導入し、該動物細胞を成長させることにより作出することができる。このようにして作出されたトランスジェニック動物は、二本鎖RNAの存在によって内在性目的遺伝子のmRNAが破壊・分解されることにより目的遺伝子がノックアウトされている。本発明において「内在性」とは、本ベクターの導入

対象となる細胞及び／又は個体において天然であるもの、並びに本ベクター導入以前から存在することを指す。また本発明において「ノックアウト」とは、遺伝子産物（例えばタンパク質）の発現を欠損させることを指す。本二本鎖RNA発現ベクターを導入する対象となる動物は、哺乳動物であれば特に限定されず、例えば、マウス、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウサギ、ラット等が挙げられる。本発明においては、疾患モデル動物として扱いやすいマウス、ラット等が好ましい。

【0037】

本ベクターを動物細胞に導入するには、上記対象動物の受精卵に注入することが好ましい。その結果、目的遺伝子の二本鎖RNAをコードする配列とその制御配列が受精卵の細胞に組み込まれ、その後の受精卵の分裂に伴って、全身の細胞に二本鎖RNAをコードする配列とその制御配列がコピーされる。

【0038】

動物細胞への遺伝子の導入方法としては、受精卵へのマイクロインジェクション法の他に、ES細胞へ導入する方法、培養細胞へ導入した細胞核を核移植により受精卵に導入する方法などが挙げられる。本ベクターのDNAを、エレクトロポレーション、リポフェクション法等によりES細胞又は他の培養細胞に導入し、ネオマイシン、プロマイシン等でポジティブ選別した後、目的の導入細胞を得る。ES細胞は、胚胎盤胞又は8細胞期胚に毛細管等を用いて注入する。核移植は、DNAが導入された細胞を核を取り除いた受精卵に注入し、電気刺激で細胞融合することにより行われる。

【0039】

その後、胚胎盤胞又は8細胞期胚を直接仮親の卵管に移植するか、一日培養して胚盤胞まで発生したものを仮親の子宮に移植する。仮親を飼育出産させて、目的の二本鎖RNAが導入された子であるトランスジェニック動物を得る。当該動物中における所望の二本鎖RNAの発現を確認するには、当該動物の体の一部（例えば尾部先端）を切断し、体細胞中のDNAを抽出して、PCR法やザザンプロット法などにより導入した配列の存在を確認する。導入した配列の存在が確認された個体を初代とすれば、二本鎖RNAはその子（F1）の50%に伝達され

る。すなわち、このトランスジェニック動物と正常動物との交配により、ヘテロ接合体動物（F1）が得られ、ヘテロ接合体同士の交配によりホモ接合体動物（F2）を得ることができる。

このようにして目的遺伝子がノックアウトされたトランスジェニック動物は、以下に記載するように疾患モデル動物、遺伝子解析用の動物などとして有用である。

【0040】

4. 疾患モデル動物

上述のようにして作出されたトランスジェニック動物は、目的遺伝子のノックアウト（変異）により、いくつかの疾患を示すモデル動物（疾患モデル動物）として利用できる可能性がある。例えばSk i遺伝子をノックアウトさせたトランスジェニック動物は、神経管の閉塞異常（Neural tube closure defect）、眼の虹彩形成異常、及び頭部での出血を呈する。頭部における出血は、本発明者により初めて見出されたものである。従って、本疾患モデル動物は、そのような疾患の研究、疾患の治療開発などにおいて有用である。

【0041】

【実施例】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれらの実施例にその技術的範囲が限定されるものではない。

【0042】

〔実施例1〕 Sk i二本鎖RNA（ds-RNA）発現ベクターの作製
 ヘアピン型RNA（すなわち、自己相補性ステムループを有するRNA）を発現するプラスミドは、図1Aに示すように、プラスミドCMV-RM（下記参照）に、Sk i遺伝子のコード領域の5'側540bp（配列番号1）を挿入し、その下流に下記の配列番号2に示す12bpのスペーサー（ループ領域）を挟んで、上記540bpの配列に対し相補的な配列を逆向きに挿入することにより構築し、CMV-RM-sk iとした。

【0043】

スペーサーの配列：

5'-GGTGCATATG-3' (配列番号2)

CMV-RMは、CMVプロモーターを有するp c DNA 3 (Invitrogen社製)に、転写されたRNAのキャップ構造を除去するリボザイムカセット (Huang, Y. and Carmichael, GC, 1996, Mol. Cell Biol. 16: 1534-1542) 及びRNAポリメラーゼIIの転写を終結させるMAZドメイン (Yonaha, M. and Proudfoot, NJ, 1999, Mol. Cell 3: 593-600) を含有するものである。またこの構築物上にポリA付加シグナルはない。

【0044】

この発現ベクターから転写されるmRNAは、12bpのスペーサー部分がループとなったステム・ループ構造を形成し、Ski mRNAの配列をもつds-RNAとなる。

【0045】

〔実施例2〕Ski ds-RNA発現ベクターによるSki発現量の低下
本実施例においては、Ski ds-RNA発現ベクターが培養細胞におけるSkiタンパク質レベルに及ぼす影響を調べた。

293T細胞は、10%FBS及び抗生素質（ペニシリン／ストレプトマイシン；Invitrogen社製）を含むDMEM (Invitrogen社製) 中で培養した。上記実施例1において作製したプラスミド及び内部対照として0.05μgのTK-Luc (Promega社製) を用いてLipofectamine (GibcoBRL) により293T細胞 (4×10⁵) をトランスフェクトした。42時間経過後、細胞をPassive Lysisバッファー (Promega) に溶解し、細胞抽出物のアリコートをルシフェラーゼアッセイ (Promega) に使用して、トランスフェクション効率を評価した。

【0046】

残りの細胞ペレットをRIPA溶解バッファー (Triton X-100 1%, デオキシコール酸ナトリウム 1%, SDS 0.1%, NaCl 0.15M, リン酸ナトリウム pH 7.2 0.01M, トラジロール 1%) に再懸濁し、ルシフェラーゼアッセイの結果に従って調整した。抗Skiモノクローナル抗体1-1、9-1、11-1及び16-1 (Nomura et al., 1999, 前掲) の

混合物を用いて、イムノプロット（ウェスタンプロッティング）をShinagawaら（Shinagawa, T, et al., 2000, EMBO J., 19: 2280-2291）に記載されているように実施した。

【0047】

ウェスタンプロッティングにより約90kDのSk i タンパク質のバンドが検出される。マウスSk i 発現ベクターと共に種々の量のSk i ds-RNA発現ベクター（CMV-RM-sk i i）を導入して、同様にウェスタンプロッティングを行うと、Sk i タンパク質の量はds-RNAの量に依存して、低下した（図2）。

【0048】

一方、ネガティブコントロールとして、実施例1に記載の手法と同様に大腸菌 β ガラクトシダーゼのmRNAに対応するds-RNA発現ベクター（CMV-RM-gal i）を作製し、このベクターを同様に、マウスSk i 発現ベクター（pact-sk i i）と共に293T細胞に導入し、Sk i 発現レベルを解析した。この場合にはSk i タンパク質レベルの低下は見られなかった（図2）。以上の結果から、Sk i ds-RNAは、動物の培養細胞内において、特異的にSk i 発現レベルを低下させることが示された。

【0049】

〔実施例3〕 Sk i ds-RNA発現ベクターを導入したトランスジェニックマウスの作出

CMV-RM-sk i i又はCMV-RM-gal iにおける2.2kbのBg I I-Bam H I断片をバックグラウンド配列から切り出し、精製して、マウス受精卵に注入した。マウス受精卵は、C57B1/6雄マウスとC57B1/6又は(C57B1/6 x DBA) F1雌マウス（いずれもクレア社より入手）との交配により得られたものである。導入遺伝子の存在とコピー数を分析するために、Sk i コード領域の最初の540bpをプローブとして用いたサザンプロット分析により胚を分析した。サザンプロット分析に用いたゲノムDNAは、胚体外組織から抽出した。結果を図3に示す。図3において左側のレーンはCMV-RM-sk i i導入トランスジェニックマウス、右側のレーンは野生型マウス

(WT) の結果を示す。図3より、トランスジェニックマウスは確かにS k iのd s - R N A 発現ベクターを有することがわかった。

【0050】

また、マウス胚について分析するために、I s o g e n (ニッポンジーン) を用いて胚の肢芽よりR N A を単離した。導入遺伝子の発現は、以下に示すプライマー対、及び以下の配列を有するリボザイムカセットの3'末端における二重蛍光プローブを用いてリアルタイムR T - P C Rにより調べた。

【0051】

(プライマー対)

CCGCCTGATGAGTCCGTGAG (配列番号3)

ATCGAAGTCATGGTGGCTA (配列番号4)

(プローブ)

GACGAAACATGCATAGGC (配列番号5)

このR T - P C Rの結果を下記表1に示す。表1中、導入遺伝子の発現量は、胚N o . 257を1. 00とした場合の相対値として表す。

【0052】

【表1】

遺伝子型	胚(No.)	導入遺伝子の発現量	神経管の異常
skii	256	0. 015	-
	257	1. 00	+
	259	<0. 002	-
	262	4. 58	+
gali	233	9. 15	-
	268	<0. 002	-

【0053】

〔実施例4〕 疾患モデルマウス

(1) 神経管形成の異常

Ski変異マウスは神経管の閉塞異常 (Neural tube closure defect) が見られることがすでに報告されている (Berk, M. et al, Genes Dev. 11:2029-2039, 1997)。本発明者は、Ski ds-RNAを発現するトランスジェニックマウスをE10.5の時期に解析し、同様の神経管閉塞異常を呈することを観察した(図4)。図4の矢印で示すように、トランスジェニックマウス(TG)においては神経管が閉じていないことがわかる。13匹のトランスジェニック胎仔のうち、5匹(38.5%)が神経管閉塞異常を示した(上記表1も参照されたい)。ネガティブコントロールとして作製した β ガラクトシダーゼds-RNAを発現するトランスジェニックマウス(9匹)では、神経管閉塞異常は観察されなかった。

【0054】

(2) 眼の形成異常

Ski変異マウスは眼の虹彩形成異常が見られることがすでに報告されている (Colmenares, C. et al., Nature Genet. 30:106-109, 2002)。本発明者は、Ski ds-RNAを発現するトランスジェニックマウスをE10.5の時期に解析し、同様の眼の虹彩形成異常が起きることを観察した(図5)。図5の矢印で示すように、トランスジェニックマウス(TG)においては眼の虹彩が部分的に欠損していることがわかる。2匹のトランスジェニック胎仔のうち、2匹(100%)共が眼の虹彩形成異常を示した。ネガティブコントロールとして作製した β ガラクトシダーゼds-RNAを発現するトランスジェニックマウス(9匹)では、眼の虹彩形成異常は観察されなかった。

【0055】

(3) 頭部での出血

本発明者は、Ski ds-RNAを発現するトランスジェニックマウスが頭部での出血を起こすことを観察した(図6)。図6において、トランスジェニックマウス(TG)及びski遺伝子変異マウス(ski-/-)は頭部出血を示している。従って、ski遺伝子変異マウスは、頭部出血のモデルマウスとして使用可能であることがわかる。

【0056】

以上の(1)～(3)の結果から、Ski ds-RNA発現ベクターを導入したトランスジェニックマウスは、Ski変異マウスと同様の異常及び頭部出血を呈することが示された。通常トランスジェニックマウスの系においては、導入された遺伝子を持つ個体のうちの20～80%の個体において、導入遺伝子効果が観察されると言われている。これは導入遺伝子が組み込まれた位置によっては、その遺伝子が発現されない場合があるからである（位置効果）。本発明者が作製したSki ds-RNA発現ベクターのトランスジェニックマウスでは、38.5%の個体において、神経管閉塞異常が観察された。これは従来のトランスジェニックマウスの報告例から見て、妥当な割合といえる。

【0057】

【発明の効果】

本発明により、目的遺伝子がノックアウトされたトランスジェニック動物及びそのための二本鎖RNA発現ベクターが提供される。本トランスジェニック動物は、RNA干渉を引き起こす二本鎖RNA発現ベクターを用いることにより、簡便かつ迅速に作出することができる。また例えばSki遺伝子をノックアウトさせた本トランスジェニック動物は、いくつかの疾患を呈するためモデル動物として用いることが可能である。さらに本二本鎖RNA発現ベクターは、RNA干渉を効率的に行えるよう構築されており、位置効果をうけることなく目的遺伝子の二本鎖RNAを発現させ、目的遺伝子の発現を抑制することができるものである。

【0058】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Oriental Yeast Co.,Ltd

RIKEN

<120> A process for producing a transgenic animal by introduction of a vector expressing a double-stranded RNA

<130> P02-0703

<160> 5

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 540

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 1

atggaagctg cagcggccgg ccggggcgcc ttccagcagc ccgggctgca gaagacgctg 60

gagcagttcc acctgagctc catgagctcg ctggcgcccg cggccgttc tcggcgcgct 120

gggcaggagg cctacaagaa ggagagcgcc aaggaggcgg gtgcggccac agtgcggcg 180

ccggtgccca ctgccgcggaa gccgcccggcc gtgctgcacc tgcctgcccc ccagccgccc 240

ccgcccgtgc ttcccgcccttcatg ccgtcgacc gctccaccga gcgcgtgttag 300

accgtgctgg aaggggagac catcttttgt ttcgtgggtgg gaggtgagaa gcgtctgtgc 360

ctgcccaga tcctcaactc ggtgctgcgc gacttctcac tgcagcagat caactccgtg 420

tgcgtatgagc tgcacatcta ctgctcgccgc tgccaccggcc accagctgga gatcctcaaa 480

gtcatggca tcctgccctt ctccgcgcc tcctgcggc tcatcaccaa gacggacgcc 540

<210> 2

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 2

ggtgcgata tg

12

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 3

ccgcctgatg agtccgtgag

20

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 4

atcgaagtca tggtggcta

19

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 5

gacgaaacat gcataggc

18

【0059】

【配列表フリーテキスト】

配列番号2～5：合成オリゴヌクレオチド

【図面の簡単な説明】

【図1】

Ski二本鎖RNA発現ベクターの構造（A）、及びSki二本鎖RNAをコードする領域（B）を模式的に示す図である。

【図2】

Ski二本鎖RNA発現ベクターを導入した培養細胞内におけるSkiタンパ

ク質レベルの低下を示すウエスタンプロット解析の結果を示す写真である。

【図3】

Ski二本鎖RNA発現ベクターが導入されたトランスジェニックマウス胚における導入遺伝子の存在を示すサザンプロット分析の結果を示す写真である。

【図4】

Ski二本鎖RNA発現ベクターが導入されたトランスジェニックマウスにおける神経管閉塞異常を示す。

【図5】

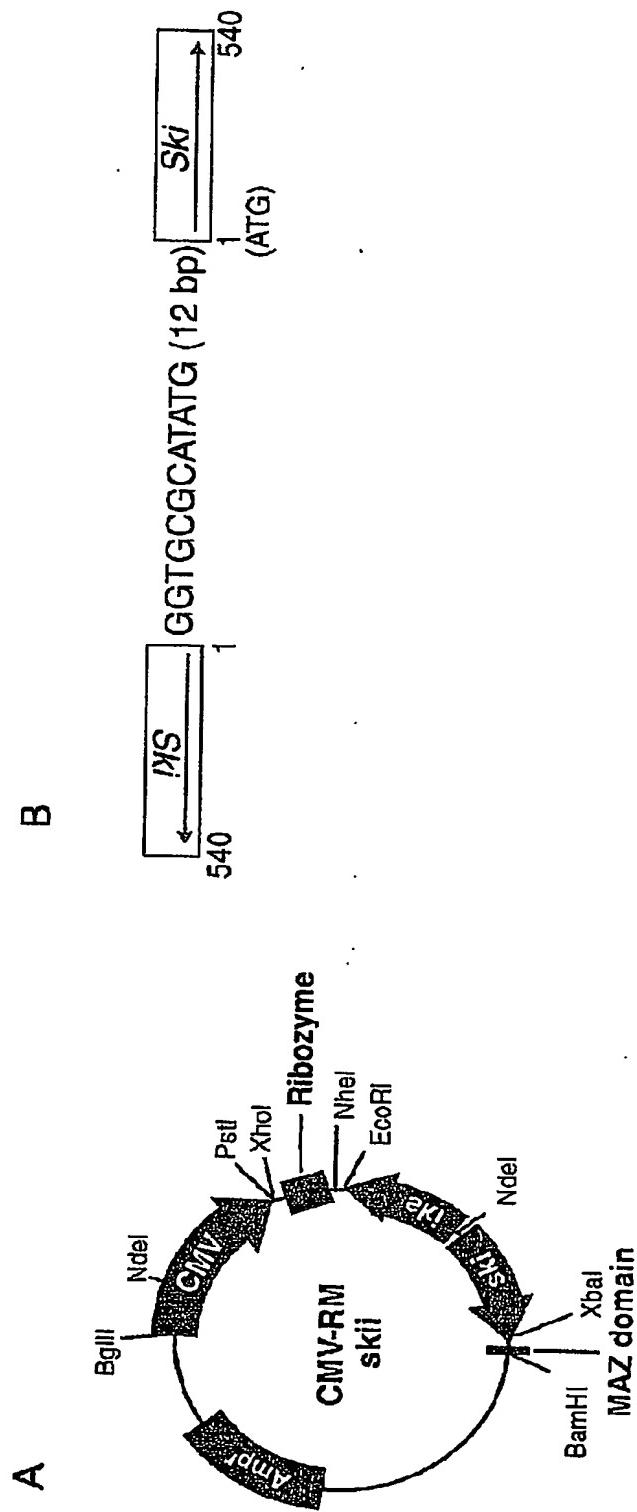
Ski二本鎖RNA発現ベクターが導入されたトランスジェニックマウスにおける眼の虹彩形成異常を示す。

【図6】

Ski二本鎖RNA発現ベクターが導入されたトランスジェニックマウスにおける頭部の出血を示す。

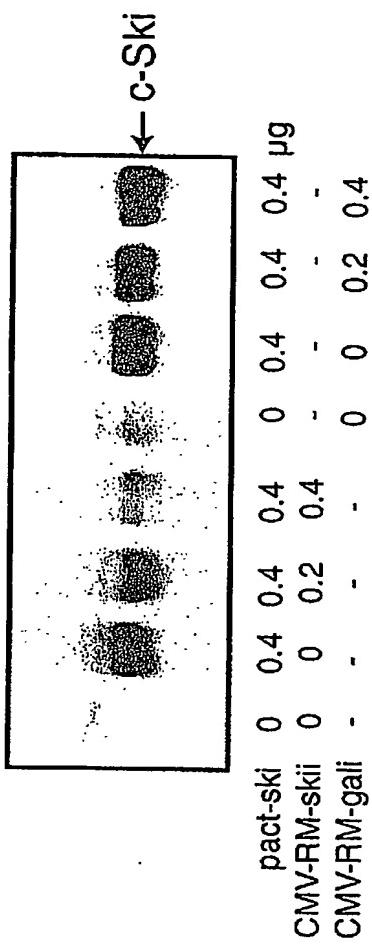
【書類名】 図面

【図1】

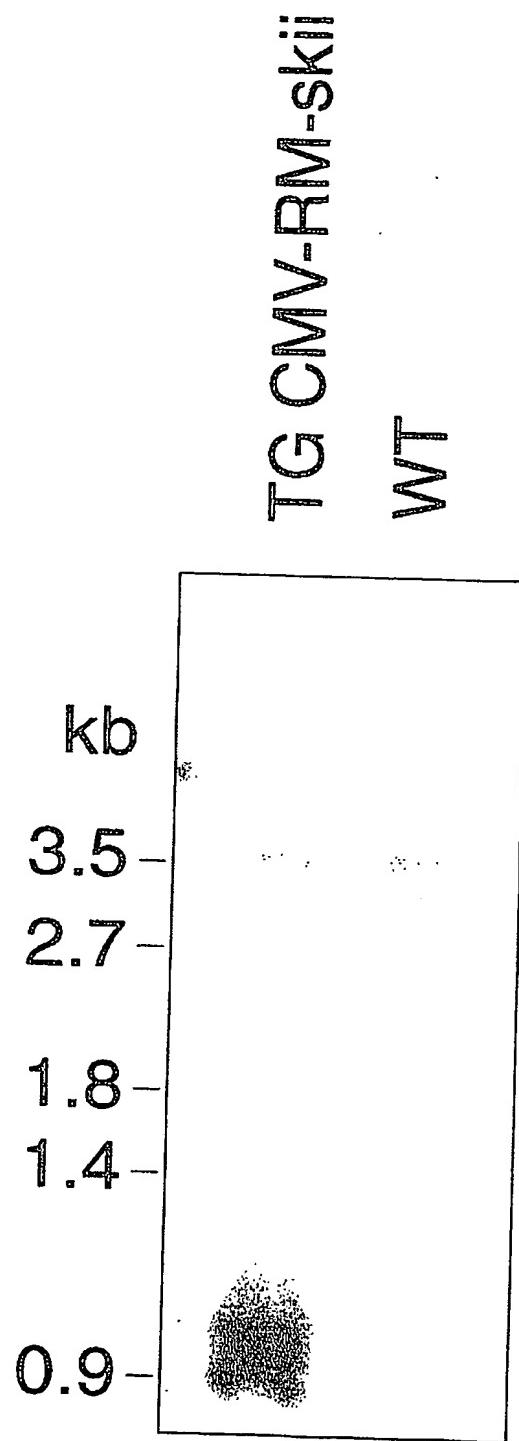


【図2】

Western blot

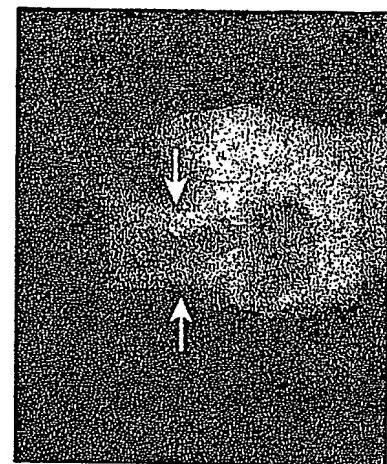


【図3】



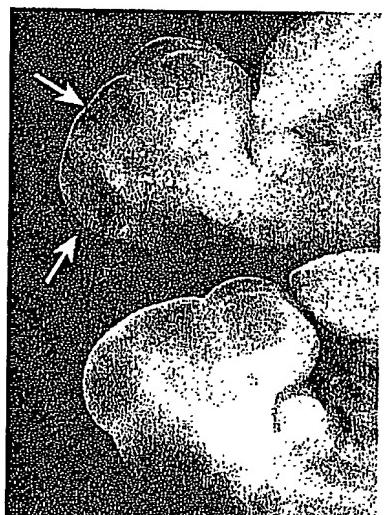
【図4】

TG



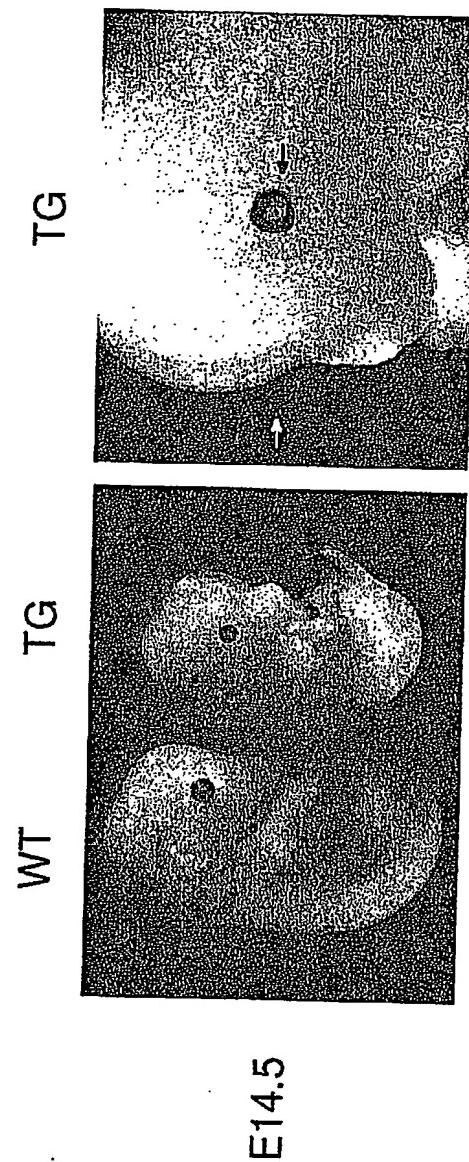
TG

WT

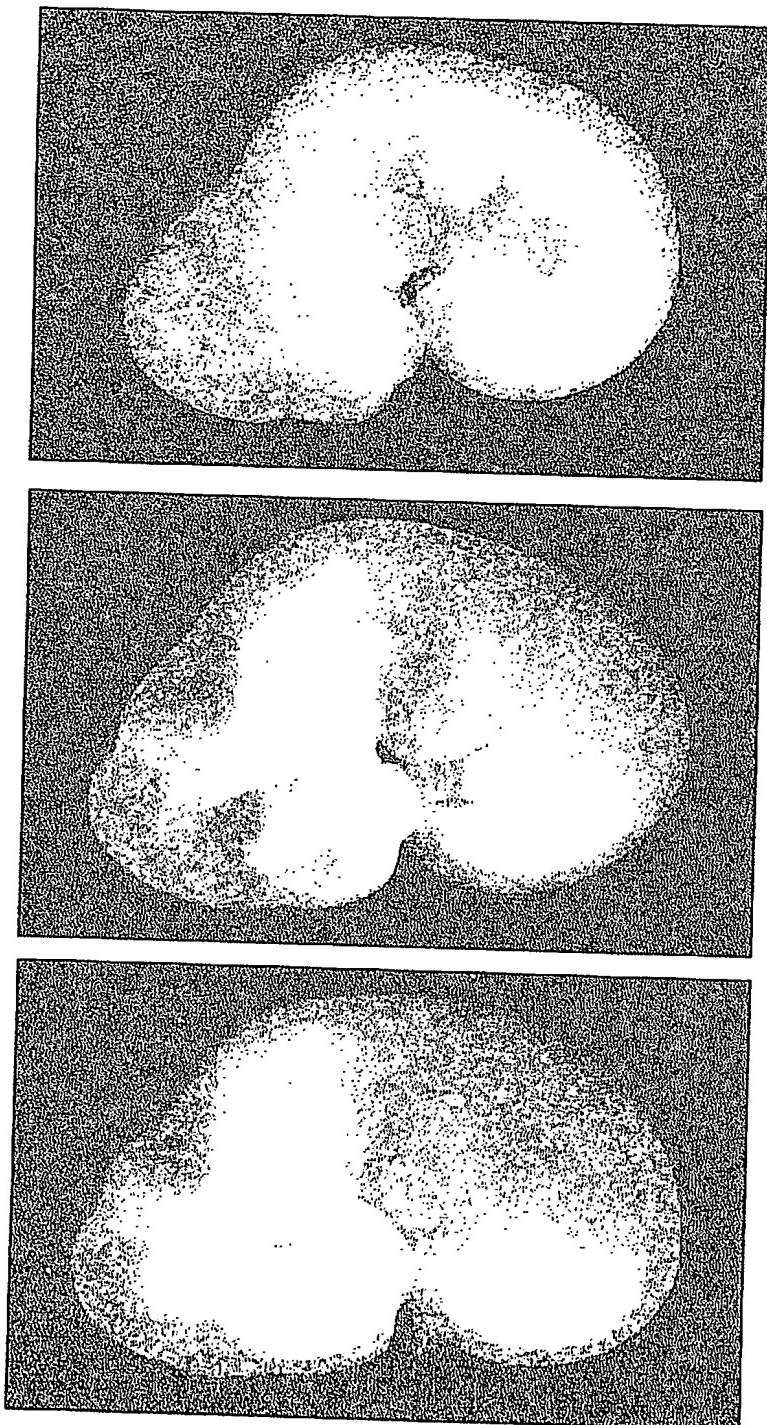


E10.5

【図5】



【図6】



E11.5

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 目的遺伝子がノックアウトされた動物を簡便かつ迅速に作出する方法及びそのツールを提供すること。

【解決手段】 目的遺伝子の二本鎖RNAの形成により内在性の目的遺伝子のmRNAを破壊することを特徴とする、目的遺伝子ノックアウト動物及び疾患モデル動物の作出方法、並びに、(a) 目的遺伝子の全部若しくは一部をコードする塩基配列、又は、該塩基配列に対し相補的な配列からなるDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするDNAをコードする塩基配列；(b) (a)の塩基配列に対し相補的であり、かつ逆配向の塩基配列；及び(c) ループ領域をコードし、上記(a)の塩基配列と(b)の塩基配列とを連結する配列；を含み、それらがRNAに転写された際に、ステム・ループ構造を有する二本鎖RNA(ds-RNA)が形成されることを特徴とする、二本鎖RNA発現ベクター。

【選択図】 なし

【書類名】 出願人名義変更届（一般承継）
【整理番号】 9756
【提出日】 平成15年10月22日
【あて先】 特許庁長官殿
【事件の表示】
　【出願番号】 特願2002-314764
【承継人】
　【識別番号】 503359821
　【住所又は居所】 埼玉県和光市広沢2番1号
　【氏名又は名称】 独立行政法人理化学研究所
【承継人代理人】
　【識別番号】 100075812
　【弁理士】
　【氏名又は名称】 吉 武 賢 次
【提出物件の目録】
　【物件名】 権利の承継を証明する書面 1
　【提出物件の特記事項】 手続補足書で提出します。
　【物件名】 委任状 1
　【提出物件の特記事項】 手続補足書で提出します。

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2002-314764
受付番号	50301752791
書類名	出願人名義変更届（一般承継）
担当官	関 浩次 7475
作成日	平成16年 1月 8日

<認定情報・付加情報>

【承継人】

【識別番号】	503359821
【住所又は居所】	埼玉県和光市広沢2番1号
【氏名又は名称】	独立行政法人理化学研究所
【承継人代理人】	申請人
【識別番号】	100075812
【住所又は居所】	東京都千代田区丸の内3-2-3 協和特許法律事務所
【氏名又は名称】	吉武 賢次

特願 2002-314764

出願人履歴情報

識別番号

[000103840]

1. 変更年月日

[変更理由]

住 所
氏 名

1990年 8月28日

新規登録

東京都板橋区小豆沢3丁目6番10号
オリエンタル酵母工業株式会社

特願 2002-314764

出願人履歴情報

識別番号 [000006792]

1. 変更年月日 1990年 8月28日
[変更理由] 新規登録
住 所 埼玉県和光市広沢2番1号
氏 名 理化学研究所

出願人履歴情報

識別番号 [503359821]

1. 変更年月日 2003年10月 1日
[変更理由] 新規登録
住 所 埼玉県和光市広沢2番1号
氏 名 独立行政法人理化学研究所